

有機リン殺虫剤の代謝と選択毒素

著者	穴戸 孝
号	105
発行年	1974
URL	http://hdl.handle.net/10097/12656

氏 名 (本籍) しし 宋 ど 戸 たかし 孝 (山形県)

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 1 0 5 号

学位授与年月日 昭 和 4 9 年 9 月 1 2 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭 和 3 0 年 3 月
東北大学農学部卒業

学位論文題目 有機リン殺虫剤の外謝と選択毒素

(主 査)
論文審査委員 教授 志 村 憲 助 教授 高 橋 甫
教授 山 下 恭 平

論文内容要旨

第 I 章 緒 言

有機リン殺虫剤は 1938 年に Schrader によって TEPP (tetraethyl pyrophosphate) が開発されて以来、数多くの殺虫性有機リン化合物が合成され農業害虫、衛生害虫の防除に広範囲にわたって使用されており、今日もなお殺虫剤の主流を占めている。初期の有機リン殺虫剤はいわゆる非選択性であったが、漸次、強い殺虫性を保持し、同時に哺乳動物に対し毒性の低い選択性を有する化合物へと移行していった。そして現在も世界の研究の方向は低毒性殺虫剤の開発に、また、選択毒性機構の解明に向けられている。しかしながら、現在まで有機リン殺虫剤の中で選択毒性機構が明確にされたのはマラソン、ジメトエート、スミチオンなどにすぎず、大部分は不明のまま残されている。

薬物が作用部位に到達し、生物に薬理作用を引き起すに必要な薬物の体内濃度は薬物の解毒化あるいは活性化作用に支配されることから、薬物の生体内変化は選択毒性の主要因の一つと考えられている。したがって、有機リン殺虫剤の選択性機構は哺乳動物と昆虫間におけるこれら殺虫剤の代謝経路や殺虫剤の活性化および解毒機構、また、それに関与する酵素(系)の分布、酵素的性質の差異などを明らかにし、代謝に基づく毒物学的意義を両生物間で比較することにより解明することができよう。

本研究では従来ほとんど知られていなかった哺乳動物と昆虫におけるリン酸トリエステル化合物の解毒化、活性化に関与する酵素(系)の検索と、その代謝機構について、 ^{32}P および ^{14}C 標識殺虫剤を使用して解明を試みた。第 II 章では dialkyl aryl phosphorothionate 系殺虫剤の脱アルキル代謝機構について、また第 III 章ではダイアジノンのグルタチオン抱合、酸化、加水分解代謝を酵素レベルから明らかにした。そして第 III 章では以上の有機リン殺虫剤の代謝的知見に基づいて、これら殺虫剤の選択毒性機構について総合的に考察した。

第Ⅱ章 ジアルキルアリール系有機リン 殺虫剤の酵素的脱アルキル化

ラット肝臓，二化メイガ幼虫，ワモンゴキブリ成虫虫体より得られた各細胞遠心分画における ^{32}P -エチルパラチオン (*O,O*-diethyl *O-p*-nitrophenyl phosphorothionate)，メチルパラチオン (*O,O*-dimethyl *O-p*-nitrophenyl phosphorothionate)，メチルパラオクソン (*O,O*-dimethyl *O-p*-nitrophenyl phosphate)，スミチオン [*O,O*-dimethyl *O*-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothionate] の酵素的分解を調べた結果，pH 7.4 のリン酸緩衝液中でジメチル系の殺虫剤が肝可溶性画分において顕著に水溶性の解毒代謝物に分解されることが見出された。ジエチル系のエチルパラチオンの場合はいずれの分画においても難分解性であった。一方，昆虫における分解活性はどの殺虫剤に対しても，また，いずれの分画においてもほとんど認められなかった(表1)。ラット肝可溶性画分による ^{32}P -水溶性代謝物はメチルパラチオンの場合は脱メチルパラチオン (*O*-methyl *O-p*-nitrophenyl phosphorothioic acid) であり，また，メチルパラオクソン，スミチオンからもそれぞれ相当するモノ脱メチル体が得られた。これら脱メチル化反応に関与する酵素はチオリン酸あるいはリン酸トリエステルの両者に作用することから，これら脱メチル化反応に関与する酵素はリン酸トリエステルの P-O-アリール結合を加水分解する既知の加水分解酵素アリールエステラーゼ (Aldridge 1953) とは異なっており，新しいタイプの酵素と推定された。本酵素はゲルろ過，透析により容易に失活するが，cofactor として GSH を添加することにより特異的に回復した。しかし他の SH 化合物は全く無効であった(表2)。メチル- ^{14}C -メチルパラチオンから *S*-methyl glutathione と脱メチルパラチオンが定量的に生成することからこの反応はアルキル基転移反応である(図1)。また，これは従来知られていなかった(チオ)リン酸トリエステル結合の新しいエステル開裂機構である。この酵素はハロゲン化アルキルと GSH との

抱合反応を触媒する薬物代謝酵素 glutathione *S*-transferase (Johnson 1966) タイプに属する。

このトランスフェラーゼは哺乳動物の各組織の可溶性画分に分布し，肝臓が最も高い活性を示した。昆虫ではカブト虫，カイコ幼虫の脂肪体，消化管の可溶性画分に分布しているが，その活性は肝臓に比し著しく低いことが認められた(表3)。酵素の至適 pH は 9.0 であり，ブロムフェノールブルーにより酵素活性は著しく阻害される。アルキル基に対しかかなりの基質特異性を示し，ジメチル系化合物には例外なく作用するが，エチルおよびプロピル基の転移はごく僅かであった。トランスフェラーゼの第 2 の基質である組織内の GSH レベルはラット肝臓がカブト虫中腸の約 5.5 倍であった。

TABLE 1
Degradation of ^{32}P -Dialkyl Aryl Phosphorothionate Insecticides
by Subcellular Fraction from Rat Liver and Insect^a

	Insecticide degraded, $\mu\text{g}/120 \text{ min.}$			
	Methyl parathion	Methyl paraoxon	Sumithion	Ethyl parathion
Rat liver				
Mitochondria	7.4	25.6	6.6	1.6
Microsomes	5.4	22.8	5.4	2.8
Soluble	117.3	224.1	101.2	3.9
Rice stem borer				
Mitochondria	2.5	—	3.8	0.7
Microsoms	2.2	—	3.1	1.1
Soluble	4.3	—	7.8	0.5
Cockroach				
Mitochondria	1.1	4.1	—	—
Microsoms	0.7	2.2	—	—
Soluble	2.7	6.8	—	—

^a The reaction mixture contained 2.5 ml of enzyme solution (tissue fraction equivalent to 500 mg of liver or insect) prepared in 0.25 *M* sucrose-0.05 *M* Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 -0.01 *M* EDTA and 360 μg of radioactive insecticides, pH 7.4, in a final volume of 3 ml. The reaction mixture was incubated for 120 min. at 37°C.

TABLE 2
Effect of Various SH-Compounds on Degradation
of ^{32}P -Methyl Parathion
by Gel Filtration Supernatant of Rat Liver

SH- compound added		Methyl parathion degraded, $\mu\text{g}/\text{reaction}$ mixture/120 min
GSH	$4 \times 10^{-3} \text{ M}$	189.7
	$4 \times 10^{-4} \text{ M}$	45.2
	$4 \times 10^{-5} \text{ M}$	18.7
	$4 \times 10^{-6} \text{ M}$	6.3
L- Cysteine	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	11.3
	$1 \times 10^{-4} \text{ M}$	8.0
Thioglycolic	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	8.8
—	—	5.1

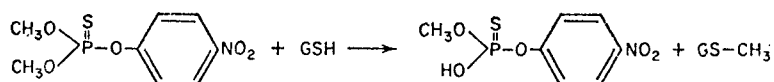


Fig. 1. Degradation of methyl parathion by glutathione S- transferase.

TABLE 3
³²P-Methyl Parathion- and Ethyl Parathion-Degrading Activity
 by Soluble Fraction from Rat and Insect Tissues^a

Tissue	Insecticide degraded, $\mu\text{g/g tissue}/120\text{min}$			
	Methyl parathion		Ethyl parathion	
	Without GSH	With GSH	Without GSH	With GSH
Rat				
Liver	165.3	243.8	3.92	4.73
Brain	5.3	24.9	0.27	1.88
Spleen	2.8	20.2	—	—
Lung	2.2	13.7	—	—
Kidney	4.5	10.0	0.14	1.60
Heart	3.2	9.3	—	—
Muscle	1.9	6.2	—	—
Blood	3.9	4.0	—	—
Horn beetle larvae				
Mid-gut	11.9	44.8	0.12	0.17
Fat body	2.8	10.8	—	—
Cuticle and muscle	0.3	7.2	—	—
Hemolymph	1.4	2.3	—	—

^a Each reaction mixture contained 2.4ml of enzyme solution (0.25g of equiv fresh wt/ml), $4 \times 10^{-3}M$ of GSH, and 300 μg of insecticide in a final volume of 3.0ml, pH 7.4.

第Ⅲ章 ダイアジノンの *in vitro* 代謝

1. ダイアジノンの GSH 抱合代謝

^{32}P -ダイアジノン〔*O,O*-diethyl *O*-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl)phosphorothionate〕はラット肝臓，ワモンゴキブリ成虫脂肪体可溶性画分により GSH 依存性の脱ピリミジン化を受け，解毒代謝物として diethyl phosphorothioic acid と 276 nm に最大吸収をもつピリミジン誘導体を生じた。ピリミジン- ^{14}C -ダイアジノンを用いて，このピリミジン代謝物を分離し，各種 co-chromatography，IR および UV-スペクトル，加水分解物などについて合成品との比較を行った結果，ダイアジノンの新規代謝物 *S*-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione と同定された。したがって，この酵素は GSH トランスフェラーゼの 1 種であり，この反応は前記アルキル基以外にアリール基の転移した最初の例である。

本酵素はラットでは主に肝臓，ワモンゴキブリ成虫では脂肪体，消化管の可溶性画分に分布し，GSH が十分量存在した場合に昆虫組織は高活性を示した（表 4）。至適 pH は 6.0 ～ 6.5 で，SH 試薬，*o*-フェナンスロリンにより阻害をうけ，同一ピリミジン構造をもつダイアゾクソン，プロピルダイアジノンは基質となる。

2. ダイアジノンのミクロゾームによる酸化代謝

ラット肝臓およびワモンゴキブリ成虫脂肪体のミクロゾーム mixed-function oxidase 系を用いて NADPH， O_2 存在下における ^{32}P -，エチル- ^{14}C -，ピリミジン- ^{14}C -ダイアジノンの酸化代謝を調べた結果，S と O との交換反応，ピリミジン側鎖の水酸化，P-O-ピリミジン結合の de-esterification の三つのタイプの酸化反応が同時に起きることが認められ，計 10 個の代謝物が得られた。殺虫性を有する（チオ）リン酸トリエステル代謝物は hydroxydiazinon 〔*O,O*-diethyl

O-(2-(2'-hydroxy-2'-propyl)-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphorothionate], diazoxon [*O,O*-diethyl *O*-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphate], hydroxydiazoxon [*O,O*-diethyl *O*-(2-(2'-hydroxy-2'-propyl)-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphate] であり, 殺虫性を失った P-O-アリール結合の開裂体は 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidine, 2-(2'-hydroxy-2'-propyl)-4-methyl-6-hydroxypyrimidine, diethyl phosphorothioic acid, diethyl phosphoric acid であった。このうち hydroxydiazoxon は diazinon の新規代謝物であり, その他 hydroxydiazinon, ピリミジン代謝物は *in vitro* 系において明らかにされた最初の例である。

肝ミクロゾーム系は脂肪体ミクロゾーム系よりダイアジノン酸化活性が高いことが認められた(表5)。ダイアジノンの酸化はピペロニルブトキサイド, SKF-525 A などのミクロゾーム酸化阻害剤により阻害を受けた。肝ミクロゾーム反応系に EDTA が存在した場合にはダイアジノン酸化代謝全体が促進されるが, とくにダイアゾクソンの反応系への集積が認められた。

3. ダイアゾクソンの加水分解代謝

ダイアジノンの活性毒物体 ^{32}P -ダイアゾクソンはラットの各体組織ホモジェネートにより急速に加水分解されて, diethyl phosphoric acid と 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidine を生成することが認められた。この分解活性は上記一連のダイアジノン代謝中で最も高く, 組織別活性は肝臓>血液>肺臓>心臓>腎臓>脳の順であった(表6)。肝臓ではミクロゾームがミトコンドリア, 可溶性画分より著しく高い活性を示した。可溶化されたミクロゾーム加水分解酵素は至適 pH が 8.8 で, $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の EDTA, $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の重金属イオン (Hg^{2+} , Cu^{2+}), $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の希土類金属イオン (Ce^{3+} , La^{3+}), $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の SH 試薬などにより阻害され, Ca^{2+} により活性化されることが認められた。したがって, 本酵素はパラオクソンを加水分解するアリールエステラーゼ (Aldridge 1953) タイプに属する。一方, ワモンゴキブリ成虫の体組織における ^{32}P -equiv

ダイアゾクソンの分解は主にGSHトランスフェラーゼによるもので，哺乳動物の肝アリールエステラーゼタイプの加水分解酵素は分布していないことが判明した。また，その他ダイアゾクソンを加水分解する酵素は見い出せなかった。

以上，本章1～3のラットとワモンゴキブリにおける *in vitro* 代謝に基づいてダイアジノンの代謝経路を示すと図2の通りである。

TABLE 4
*Diazinon-Degrading Activity of Tissue
Homogenates of Rat and
American Cockroach^a*

Tissue	Diazinon degraded, μg/g tissue/120 min	
	Without GSH	With GSH
Rat		
Liver	71.4	189.8
Heart	2.9	10.7
Brain	5.0	8.9
Lung	3.2	7.6
Kidney	0.8	7.6
Blood	3.9	6.9
American cockroach		
Fat body	41.7	323.9
Gut	23.6	139.3
Muscle and cuticle	8.2	74.0
Hemolymph	9.5	10.0

^a Each reaction mixture contained a homogenate of 100 mg of fresh tissue in 0.25 M sucrose, 2×10^{-3} M GSH, and 300 μg of Diazinon, in a final volume of 3.0 ml of 0.05 M Na₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer, pH 6.0, for tissues from rat and pH 6.5 for tissues from American cockroach. The mixture was incubated for 120 min at 37°C. The activity was assayed by counting radioactivity of the water-soluble fraction of the incubation mixture.

TABLE 5
*Oxidative Metabolism of ³²P-Labeled Diazinon by Microsomes from Rat Liver and American
Cockroach Fat Body^a*

Cofactor	Radiophosphorus recovered as indicated product (%)									
	<i>R_f</i> ^b	Ether-soluble					<i>R_f</i> ^c	Water-soluble		
		0.76 Diazinon	0.52 A	0.35 B	0.19 C	0.11 D		0 E	0.75 F	0.66 G
Rat liver										
None	95.0	0.6	0.5	0.4	0.2	0.2	>—	3.1	—<	
NADPH	54.9	3.1	7.3	1.6	0.4	0.3	21.8	9.3	1.3	
NADH	73.5	2.5	3.1	0.8	0.1	0.1	13.5	5.6	0.8	
Cockroach										
fat body										
None	97.9	0.1	0.5	0.1	0	0.2	>—	1.2	—<	
NADPH	88.1	0.7	3.3	0.3	0.1	0.2	4.9	2.0	0.4	
NADH	90.9	0.4	2.5	0.2	0	0.2	4.4	1.1	0.3	

^a The reaction mixture contained 1 ml of enzyme solution prepared in 0.25 *M* sucrose-0.05 *M* Na₂HPO₄-KH₂PO₄-0.01 *M* EDTA medium, pH 7.4 (microsomes equivalent to 200 mg of fresh tissue), 1 ml of 0.1 *M* Na₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer, 2 μmoles of cofactor as indicated, and 50 μg of radioactive diazinon, pH 7.4, in a final volume of 2 ml. The reaction mixture was incubated for 120 min at 37°C.

^b *n*-Hexane-acetone (4:1)/Silica gel G.

^c Isopropanol-ammonia (3:1)/Toyo paper No. 50.

A = Hydroxydiazinon, B = Diazoxon, C = Hydroxydiazoxon

TABLE 6
*Degradation of ³²P-Diazoxon by Tissue
Homogenates of Rat^a*

Liver (47.7)	Blood (4.7)
Lung (1.6)	Heart (1.0)
Kidney (0.7)	Brain (0.2)

^a The results are given as diazoxon degraded, mg/g tissue/120 min in parentheses. The incubation mixture in a total volume of 3 ml consisted of ³²P-diazoxon (300 μg), fresh tissue homogenate, and 0.05 *M* Tris-HCl buffer, pH 7.8. The mixture was incubated for 120 min at 37°C.

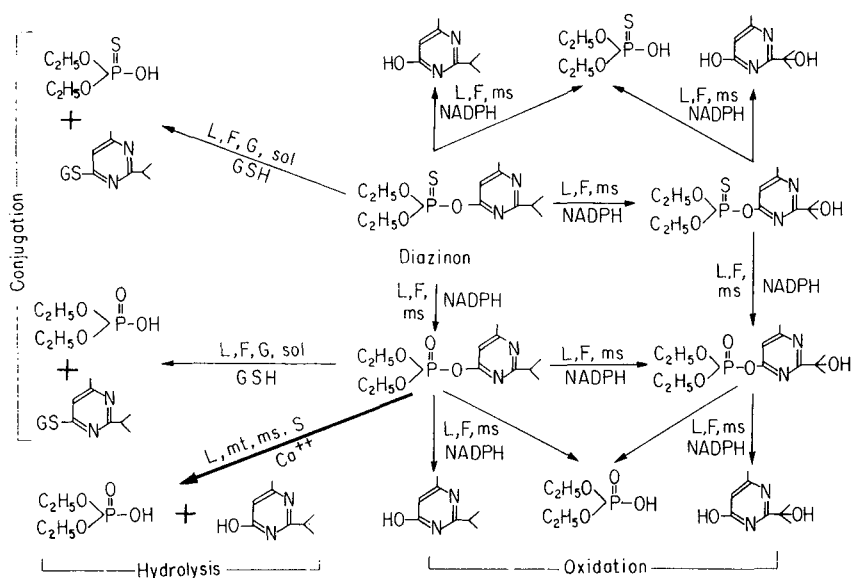


FIG. 2. Metabolic pathways of diazinon in mammals and insects based on *in vitro* study (L: rat liver, S: rat serum, F: American cockroach fat body, G: American cockroach gut, mt: mitochondria, ms: microsomes, sol: soluble).

第Ⅳ章 有機リン殺虫剤の代謝と選択毒性機構

1. *O, O*-dialkyl *O*-aryl phosphrothionate 殺虫剤の選択毒性

O, O-dialkyl *O*-aryl phosphorothionate 殺虫剤の化学構造と選択毒性の関連については Schrader (1963) ならびに 西沢 (1965) はアルキル基がジメチル基の場合に特異的に選択性が現われると指摘した。一方、これら殺虫剤の哺乳動物における *in vitro* 代謝では代謝物として脱アルキル分解物がジメチル体の場合のみ多量に見い出され、ジエチル体は脱アリール分解物がそのほとんどである。また、昆虫では両薬剤ともに脱アリール化経路を介して解毒を受けることなどが明らかにされている (Plapp & Casida 1958; Hollingworth *et al.* 1967)。

したがって、これらの結果とジメチル体が哺乳動物酵素により脱メチル化を受けやすいという前記 *in vitro* における結果とを総合的に考察すると dialkyl aryl phosphorothionate 殺虫剤の選択毒性、低毒性機構は代謝面からは次のように結論される。

ジメチル系殺虫剤の哺乳動物 - 昆虫間の選択毒性は脱メチル分解に関与する GSH トランスフェラーゼの分布量の差と基質 GSH レベルの差に基づいており、また、ジエチル系よりジメチル系の哺乳動物に対する低毒性の要因はこの酵素の基質特異性に帰せられる。

2. ダイアジノンの選択毒性

ダイアジノンはジエチル系にもかかわらず哺乳動物に低毒性で代表的な選択性殺虫剤の一つである。ダイアジノンは哺乳動物、昆虫において、GSH 抱合、酸化、加水分解などの三つのタイプの代謝をうけ活性化あるいは解毒化を受けることを酵素的に明らかにした。これらの結果を毒物学的に考察してみると活性毒物体ダイアゾクソンの加水分解酵素は他の代謝系に比し非常に高い解毒活性を有し、しかも哺乳動物の体組織のみに分布していることから、ダイアジノ

ンの選択毒性にはこの酵素がきわめて重要な機能をはたしていると酵素レベルから推論される。さらにこの見解は哺乳動物に比し、昆虫体内にダイアゾクソンが異常に多く集積するというダイアジノンの *in vivo* 代謝の結果 (Krueger *et al.* 1960) ともよく一致している。

要 約

1. ラット肝可溶性画分にジメチル系有機リン殺虫剤を脱メチル分解する新しい有機リン剤解毒酵素を見い出した。

$\text{CH}_3\text{-O-P}$ 結合の開裂はGSH依存性でメチル基転移反応であることを明らかにし, 1種のGSHトランスフェラーゼが関与した(チオ)リン酸トリエステル化合物の新しい薬物代謝機構を確立した。

トランスフェラーゼ活性は昆虫においても認められるが哺乳動物に比し低く, また, この酵素はジエチル, ジプロピル系殺虫剤には作用し難いことを明らかにした。

2. ダイアジノンはラット肝およびワモンゴキブリ脂肪体のGSHトランスフェラーゼによりP-O-ピリミジン結合の開裂をうけ, 新規代謝物 *S*-(2-*iso*-propyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione が生成することを明らかにした。

ラット肝臓とワモンゴキブリ脂肪体のミクロゾーム mixed-function oxidase 系によりダイアジノンはSとOとの交換反応, ピリミジン側鎖の水酸化, P-O-ピリミジン結合の開裂をうけ, 新規代謝物を含め10種の活性あるいは解毒代謝物を同定した。

ダイアジノンの活性毒物体ダイアゾクソンはラット肝臓および血清の加水分解酵素により急速に分解されること, そしてこの酵素は昆虫には存在しないことを明らかにした。

3. 以上の諸知見から, ジメチル系有機リン殺虫剤の選択毒性, 低毒性機構は生物間におけるGSHトランスフェラーゼの分布量の差や, 酵素の基質特異性が関与しており, またダイアジノンでは哺乳動物のダイアゾクソン加水分解酵素が主要な選択性因子であると考ええる。

審 査 結 果 の 要 旨

有機リン殺虫剤は、農業害虫、衛生害虫等の防除に広く使用されておるが、その有する強い毒性は動物に対しての薬害として屢々問題となっており、現在、より底毒性殺虫剤の開発が強く望まれている。本研究は、上記の目的を達する基礎として、有機リン殺虫剤の選択毒性の機構を明らかにしようとして行われたものである。

著者は先づ、リン酸トリエステル化合物の活性化および解毒化に関与する酵素系を哺乳動物および昆虫について、 ^{32}P および ^{14}C 標識殺虫剤を用いて詳細に比較検討した。その結果、ジメチル系の殺虫剤が、ラット肝可溶性画分によって顕著に解毒代謝物に分解されること発見した。ジェチル系殺虫剤ではこの解毒反応は進行しなかった。この反応はグルタチオンの添加によって著しく促進されることから、 ^{14}C -メチルパラチオンを用いてさらに詳細に検討し、この反応は、メチルパラチオンとグルタチオンとの間のメチル基転移反応によるものであることを明らかにした。これは従来知られていなかった新しい（チオ）リン酸トリエステル化合物の解毒機構であり、重要な発見である。このトランスフェラーゼは、哺乳動物の肝でもっとも活性が高く、昆虫の脂肪体、消化管等では極めて低い活性しか示さず、選択毒性機構の解明の一つの手懸りを与えた。

ついで著者は、ジェチル系のリン酸トリエステル化合物であるにもかかわらず、哺乳動物には低毒性である代表的な選択性殺虫剤であるダイアジノンについて、その解毒機構を検索した。この殺虫剤は、哺乳動物および昆虫において、上記のグルタチオントランスフェラーゼによりピリミジン環部分がグルタチオンに移転する反応、ラット肝あるいは昆虫脂肪体のミクロソームによる酸化反応、ダイアゾクソンを経て加水分解される反応の3種の代謝経路により分解されることを明らかにした。これらの各反応を哺乳動物と昆虫の組織で比較し、昆虫では、ダイアジノンの活性毒物体であるダイアゾクソンを加水分解する酵素が存在しない事実から、この加水分解酵素系がダイアジノンの選択毒性の主要因であろうと結論した。

以上の如く、従来ほとんど明らかにされていなかった有機リン殺虫剤の選択毒性について、リン酸トリエステル化合物を中心に研究を進め、その解毒機構を明らかにすることができた。本研究は今後の農薬の開発に重要な基礎を与えるもので、農学博士の学位を授与するに充分の価値あるものと認める。